

Determining activity of nucleic acid, useful for optimizing therapeutic or diagnostic nucleic acids, by transforming organisms, in parallel, with many different sequences

Publication number: DE10036175

Publication date: 2001-06-28

Inventor: BUCKEL PETER (DE); PESSARA ULRICH (DE)

Applicant: XANTOS BIOMEDICINE GMBH (DE)

Classification:

- international: *C07H21/00; C12N5/10; C12N15/10; C12N15/63; C12Q1/68; C07H21/00; C12N5/10; C12N15/10; C12N15/63; C12Q1/68; (IPC1-7): C12Q1/68; C07H21/00; C12N5/10; C12N15/63*

- European: C12N15/10C15

Application number: DE20001036175 20000725

Priority number(s): DE20001036175 20000725; DE19991062604 19991223

Report a data error here

Abstract of DE10036175

Determining the biological activity of nucleic acid sequences (I) by: (i) inserting, in parallel, many expression vectors, each containing a test (I) linked to control sequences, into many separate populations of the same type of target organism; (ii) allowing expression of (I), and (iii) determining the activity of (I) in the individual populations. Only one, or a few, different (I) are present in any single population.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



①9 **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 100 36 175 A 1**

⑤1 Int. Cl.7:
C 12 Q 1/68
C 12 N 15/63
C 12 N 5/10
C 07 H 21/00

⑳ Aktenzeichen: 100 36 175.7
㉔ Anmeldetag: 25. 7. 2000
㉕ Offenlegungstag: 28. 6. 2001

DE 100 36 175 A 1

⑥6 Innere Priorität:
199 62 604. 9 23. 12. 1999

⑦1 Anmelder:
xantos biomedicine GmbH, 82152 Planegg, DE

⑦4 Vertreter:
Weickmann & Weickmann, 81679 München

⑦2 Erfinder:
Buckel, Peter, Prof. Dr., 82347 Bernried, DE; Pessara,
Ulrich, Dr., 82362 Weilheim, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ⑤4 Screening-Verfahren für Nukleinsäuren
⑤7 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von Nukleinsäuresequenzen und die Verwendung der auf diese Weise indentifizierten Nukleinsäuresequenzen zur Bereitstellung diagnostischer und therapeutischer Mittel.

DE 100 36 175 A 1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von Nukleinsäuresequenzen und die Verwendung der auf diese Weise identifizierten Nukleinsäuresequenzen zur Bereitstellung diagnostischer und therapeutischer Mittel.

Bisherige Verfahren zum Identifizieren der Aktivität von Nukleinsäuresequenzen beinhalten eine Expressionsklonierung, wobei im allgemeinen eine Genbibliothek, d. h. eine Vielzahl von unterschiedlichen Nukleinsäuresequenzen, gemeinsam durch eine Transfektion bzw. Transformation in eine Population von Zielorganismen eingebracht wird. Nach Expression der transfizierten bzw. transformierten Nukleinsäure werden einzelne Zielorganismen, die eine gesuchte Aktivität, z. B. die Expression eines Antigens für einen Antikörper etc. aufweisen, von den übrigen Zielorganismen physikalisch getrennt. Aus den auf diese Weise isolierten einzelnen Zielorganismen wird die transfizierte bzw. transformierte DNA, die häufig als extrachromosomales Plasmid vorliegt, isoliert und amplifiziert, z. B. durch Vermehrung in Bakterienzellen. Aus diesen Bakterienzellen wird die DNA dann erneut isoliert und in Säugerzellen transfiziert. Durch mehrere Runden dieses Vorgehens wird die gesuchte Nukleinsäure angereichert. Nachteilig an diesen Verfahren ist, dass (a) pro Zelle mehrere Gene aufgenommen werden können (Mischung von Aktivitäten, Verlust einer klaren Aussage, Verminderung des spezifischen Signals etc.); (b) nur wenige Zellen den gewünschten Effekt zeigen (keine statistischen Aussagen möglich); (c) nur schwer eine Automatisierung möglich ist, da kein linearer Weg vorhanden ist (zirkulierende Ansätze); (d) die DNA in den Zellen für eine spätere Isolierung intakt bleiben muß (bei z. B. Apoptose nicht durchführbar).

Die deutsche Patentanmeldung 199 50 585.0 schlägt ein Verfahren zur Identifizierung von Nukleinsäuresequenzen vor, die in einer Zielzelle eine nichtselektionierbare Aktivität, insbesondere eine Apoptose-Aktivität aufweisen, wobei eine DNA-Bibliothek in Wirtszellen bereitgestellt wird, die einen Expressionsvektor in operativer Verknüpfung mit einer in einer Zielzelle aktiven Expressionkontrollsequenz enthalten, die Wirtszellen kultiviert werden, der Expressionsvektor aus den kultivierten Wirtszellen gewonnen wird, der Expressionsvektor und ein Reportervektor in eine Zielzelle eingebracht wird und die Aktivität des Reportervektors in den Zielzellen oder in deren Kulturüberstand als qualitatives oder quantitatives Maß für die nichtselektionierbare Aktivität der untersuchten Nukleinsäuresequenz bestimmt wird.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von Nukleinsäuresequenzen, welches auch Nukleinsäuresequenzen mit einer selektionierbaren Aktivität erfaßt.

Das Verfahren umfaßt die Schritte:

- (a) paralleles Einbringen einer Vielzahl von Expressionsvektoren, die jeweils eine zu untersuchende Nukleinsäure in operativer Verknüpfung mit einer Expressionkontrollsequenz enthalten, in eine Vielzahl von jeweils separaten Populationen gleichartiger Zielorganismen, wobei jeweils nur eine einzige Nukleinsäuresequenz oder eine geringe Anzahl von verschiedenen Nukleinsäuresequenzen in eine separate Population gleichartiger Zielorganismen eingebracht wird,
- (b) Bewirken einer Expression der Nukleinsäuresequenz in den Zielorganismen und
- (c) Bestimmen der Aktivität der Nukleinsäuresequenz in den einzelnen Populationen von Zielorganismen.

Das Verfahren ist ein Screening-Ansatz zur parallelen Bestimmung einer Vielzahl von Nukleinsäuren. Aufgrund des Einbringens einer einzigen Nukleinsäuresequenz oder einer geringen Anzahl von Nukleinsäuresequenzen in jeweils separate Populationen von Zielorganismen entstehen Populationen von gleichbehandelten Zielorganismen, die eine sensitive Auswertung der Screens erlauben. Das Schicksal der in die Zielorganismen eingebrachten Nukleinsäuresequenzen ist dabei nicht relevant, da vorzugsweise nur ein Aliquot der zu untersuchenden Nukleinsäuresequenzen verwendet wird und der Rest für nachfolgende Untersuchungen zurückbehalten wird.

Die zu untersuchenden Nukleinsäuresequenzen können grundsätzlich aus beliebigen Quellen stammen, z. B. aus Eukaryonten wie Pflanzen, Wirbeltieren z. B. Säugern, Pilzen, Parasiten etc., aber auch Bakterien, Archaea oder Viren oder aus synthetischen oder semisynthetischen Quellen. Sie werden beispielsweise aus genomischen Sequenzen, cDNA-Sequenzen, cDNA-Fragmenten oder Teilsequenzen oder auch aus synthetisch erzeugten Sequenzen wie etwa Antisense-Molekülen oder kombinatorisch modifizierten Nukleinsäuresequenzen beliebiger Herkunft oder für RNAi geeigneten Sequenzen ausgewählt.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht die Bestimmung von Nukleinsäuresequenzen mit beliebiger Aktivität, sofern diese in den mit den Nukleinsäuresequenzen transfizierten oder transformierten Zielorganismen bestimmt werden kann. Die Aktivität der Nukleinsäuresequenzen kann eine selektionierbare oder nichtselektionierbare Aktivität sein. Eine nichtselektionierbare Aktivität bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die betreffende Nukleinsäure nicht stabil in einem Zielorganismus rekombinant (über-)exprimiert werden kann, beispielweise weil sie das Wachstum der Zelle hemmt oder den Zelltod herbeiführt. Andererseits können selbstverständlich auch Nukleinsäuresequenzen mit einer selektionierbaren Aktivität bestimmt werden, wobei jedoch klargestellt werden muß, dass das erfindungsgemäße Verfahren keine Selektion, sondern eine Reihenuntersuchung an einer Vielzahl von transfizierten bzw. transformierten Zielorganismen umfaßt. Die Selektionierbarkeit drückt nur die theoretische Möglichkeit aus, den entsprechenden zellulären Effekt auch in einem Selektionsschema zur Isolation von Nukleinsäuren verwenden zu können. Vorteilhaft ist die Verwendung eines Screens, da dadurch die zuvor beschriebenen Nachteile einer Positiv-Selektion überwunden sind.

Bevorzugte Beispiele für die Aktivität von Nukleinsäuresequenzen sind die DNA-Reparatur, die transkriptionelle Aktivierung von Genen, die Aktivierung bzw. Hemmung der Sekretion von Proteinen oder der Aktivität von Proteasen, die Aktivierung oder Hemmung der Telomeraseaktivität, die Generation bzw. Aufhebung von Protein/Protein- oder Protein/DNA-Interaktionen etc.

Schritt (a) des Verfahrens besteht darin, eine Vielzahl von Expressionsvektoren bereitzustellen, die jeweils eine zu untersuchende Nukleinsäuresequenz in operativer Verknüpfung mit einer Expressionkontrollsequenz enthalten, und diese Vielzahl von Expressionsvektoren jeweils separat in eine Vielzahl von Populationen gleichartiger Zielorganismen einzubringen. Die Vielzahl von Expressionsvektoren kann eine DNA-Bibliothek sein.

Diese DNA-Bibliothek ist vorzugsweise – insbesondere wenn es sich um eine cDNA-Bibliothek handelt – eine normalisierte Bibliothek, d. h. eine Bibliothek, die an abundanten Spezies abgereichert ist. Die Herstellung solcher normalisierten Bibliotheken wurde von Sasaki et al. (Nucleic Acids Res. 22 (1994), 9987–9992) beschrieben. Die Abrei-

cherung abundanter Spezies in einer Population von mRNA-Molekülen wird durch Zugabe von beispielsweise auf Latexbeads immobilisierten cDNA Molekülen, gegebenenfalls in mehreren Hybridisierungsrounds erreicht. Es können jedoch auch nicht normalisierte DNA-Bibliotheken als Ausgangsmaterial eingesetzt werden, z. B. Bibliotheken, die eine Kollektion von definierten Nukleinsäuren wie etwa Genen enthalten.

Dabei ist es möglich – nach Feststellung der weitgehenden oder vollständigen genomischen Sequenzen oder aller exprimierten Sequenzen eines Organismus – Genbibliotheken zu verwenden, die jedes Gen nur ein einziges Mal beinhalten. Anstatt abundante Gene abzureichern, geht man hier von der Kollektion aller transkribierten Sequenzen aus und stellt die Bibliothek entsprechend zusammen. Solche Genbibliotheken werden gerade aufgebaut und sollen jedes Gen einer Spezies in einer exprimierbaren Form enthalten (Strausberg et al., Science 286 (1999), 455–457).

Die zu untersuchenden Nukleinsäuresequenzen befinden sich in einem Expressionsvektor, der in dem jeweils gewünschten Zielorganismus, vorzugsweise einer eukaryontischen Zelle oder einem eukaryontischen Organismus, und insbesondere einer Säugerzelle aktiv ist, d. h. die zu untersuchende Nukleinsäure steht auf dem Expressionsvektor in operativer Verknüpfung mit einer im Zielorganismus konstitutiv oder regulierbar aktiven Expressionskontrollsequenz. Da eine Selektion des Expressionsvektors im Zielorganismus nicht durchgeführt werden muß, ist das Vorhandensein von Elementen, die eine Selektion im Zielorganismus erlauben, nicht notwendig. In manchen Ausführungsformen ist das Fehlen von Elementen, die eine Selektion im Zielorganismus erlauben, sogar bevorzugt.

Der Expressionsvektor ist zweckmäßigerweise ein extrachromosomaler Vektor und insbesondere ein transient transifizierbares Plasmid. Alternativ kann jedoch auch ein stabiler episomaler Expressionsvektor eingesetzt werden. Derartige Expressionsvektoren sind dem Fachmann auf dem Gebiet der Molekularbiologie bekannt und beispielsweise bei Sambrook et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, oder in anderen Standardlehrbüchern beschrieben.

Die Expressionsvektoren können auf beliebige Weise erzeugt werden, beispielsweise durch Kultivierung in Wirtszellen, bei denen es sich vorzugsweise um Bakterienzellen, insbesondere um gramnegative Bakterien und besonders bevorzugt *E. coli* Zellen handelt. In diesem Fall enthält der Expressionsvektor zweckmäßigerweise Elemente, die eine Replikation und Selektion in der Wirtszelle ermöglichen. Die Kultivierung der Wirtszellen erfolgt vorzugsweise einzeln, beispielsweise durch Ausplattieren von einzelnen Klonen einer Nukleinsäurebibliothek auf festen Kulturplatten oder entsprechende Verdünnung flüssiger Kulturmedien. Gegebenenfalls können auch mehrere Wirtszellen, z. B. kleine Pools von maximal bis zu zehn verschiedenen Klonen gemeinsam kultiviert werden, obwohl dies in den meisten Fällen weniger bevorzugt ist.

Zur Gewinnung der DNA aus Wirtszellen können aus dem Stand der Technik bekannte Methoden zur Isolierung extrachromosomaler DNA (siehe z. B. Sambrook et al., supra) eingesetzt werden. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die aus der Wirtszelle isolierte DNA eine ausreichende Reinheit aufweisen sollte, um die spätere Transfektion des Zielorganismus mit hoher Effizienz zu ermöglichen. Bei bakteriellen Wirtszellen wird vorzugsweise eine alkalische Lyse durchgeführt. Die Qualität der erhaltenen Plasmid-DNA kann durch Adsorption an eine feste Matrix, insbesondere eine Silika-Adsorptionsmatrix, Waschen mit organischen Lösungsmitteln und anschließende Elution verbessert

werden. Die Expressionsvektoren können in zirkulärer oder in linearer Form in die Zellen eingeführt werden.

Alternativ können die Expressionsvektoren auch durch in vitro Amplifikation in ausreichender Menge erzeugt werden, z. B. durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Ligase-Kettenreaktion (LCR) oder Rolling-Circle-Amplifikation.

Weiterhin beinhaltet Schritt (a) das Einbringen eines Expressionsvektors in eine Population von gleichartigen Zielorganismen, wobei vorzugsweise jeweils nur ein einziger Expressionsvektor in eine solche Population von Zielorganismen eingebracht wird. Bevorzugt werden als Zielorganismen eukaryontische Zellen wie etwa Säugerzellen, insbesondere humanen Zellen, aber auch Pilze wie Hefen, Parasiten wie Trypanosomen etc. verwendet. Vorteilhaft ist die Verwendung von intakten Organismen gegenüber Zellkulturen, da sich viele Krankheiten und zelluläre Effekte erst in dem Zwischenspiel vieler verschiedenen Zelltypen in einem höheren Organismus beobachten lassen. Auch Zielorganismen prokaryontischen Ursprungs, z. B. Bakterienzellen können eingesetzt werden. Von prokaryontischen Organismen werden vorzugsweise Pathogene verwendet, deren Physiologie sich durch diesen Screen untersuchen lässt, vor allem auch im Hinblick auf therapeutische Eingriffe. Dazu können z. B. einzelne Schritte im Vermehrungszyklus untersucht werden, wie die Ausbildung von Oberflächenstrukturen zum Anheften und Eindringen in die Wirtszelle. Mit diesem Screen sind Nukleinsäuren für Proteine isolierbar, die hemmend auf die Ausprägung des jeweiligen zellulären Effekts der (pathogenen) Organismen wirken. Dies ist vor allem von Vorteil, wenn Vorgänge bei Zellen untersucht werden, die keinem starken Selektionsdruck unterliegen, da sie für deren Überleben nicht essentiell sind (z. B. Anheftungsrezeptoren). Ebenso können komplexere Organismen mit Ausnahme des Menschen als Zielorganismus eingesetzt werden, z. B. Zebrafische, Mäuse, *Drosophila* oder Nematoden wie *C. elegans*. Dabei kann die Quelle der zu untersuchenden Nukleinsäuren und der Zielorganismus gleich oder verschieden, z. B. unterschiedliche Säugerspezies, sein.

Die Zielorganismen können gegebenenfalls mutiert oder genetisch manipuliert sein, d. h. sie können – im Vergleich zu einem entsprechenden Wildtyporganismus – eine oder mehrere Nukleinsäuresequenzen, gegebenenfalls organismusfremde Nukleinsäuresequenzen, überexprimieren. Alternativ können auch Zielorganismen verwendet werden, bei denen – gegenüber dem Wildtyp – eine Nukleinsäuresequenz nur im verringerten Ausmaß, nur im geringen Ausmaß, gar nicht oder in einer mutierten Form exprimiert wird. Hefe, *C. elegans* und *Drosophila* sind in der Genetik als Modellorganismen seit langem etabliert. Es kann daher auf viele Mutationen zurückgegriffen werden, die man in den Screen einsetzen kann (Hartwell et al., Science 248 (1997), 1064–1068). Diese entsprechen zum Teil Mutationen, die als ursächlich für humane Krankheiten erkannt sind. Alternativ können solche Mutationen in diesen Modellorganismen erzeugt werden. Diese genetisch bedingten Defekte lassen sich durch die Einbringung von komplementierenden Nukleinsäuren mit dem hier beschriebenen Screen beheben. Dies kann zu einer raschen Aufklärung der für bestimmte Mutationen verantwortlichen Gene führen. Andererseits können auch Nukleinsäuren isoliert werden, die die ursprünglichen Defekte korrigieren, ohne selbst das ursprünglich mutierte Gen zu sein ("Kompensation"). Vorteilhaft ist die Verwendung dieses Screens, da die dysregulierte Expression von vielen Genen – und damit auch von solchen, die Mutationen komplementieren können – für Organismen in späteren Entwicklungsstadien oft lethal und damit nicht durch eine konventionelle positive Selektion isolierbar ist.

In mehreren Organismen wurde "RNA Interference

(RNAi)" beschrieben. Dabei wird das endogene Gen durch Expression von doppelsträngiger RNA inaktiviert (Bosher and Labouesse, Nat. Cell. Biol. 2 (2000), E31–36). Der hier beschriebene Screen eignet sich besonders gut für die Durchführung einer genetischen Detektion von Genen, deren Inaktivierung zu detektierbaren Veränderungen führt. Dies kann sowohl in intakten Organismen als auch in Zelllinien durchgeführt werden. Geeignet sind auch Organismen und Zelllinien, die genetisch so manipuliert worden sind, dass RNAi möglich ist. *C. elegans* eignet sich für solche Untersuchungen besonders, da die entsprechenden Gensequenzen nur durch Verfüttern von Bakterien, die die Klone aus einer Genbibliothek enthalten, in diesem Organismus exprimiert werden können. Dies geschieht offensichtlich durch Aufnahme der Bakterien im Darm der Tiere und durch den Aufschluß und die Freisetzung der DNA in *C. elegans* (Timmons and Fire, Nature 395 (1998), 854). RNAi benötigt Doppelstrang-RNA. In dem hier vorgeschlagenen Screen wird aber nur die sense-RNA von dem jeweiligen Plasmid generiert. Um RNAi für diesen Screen zu adaptieren, ist es daher notwendig, Plasmide zu verwenden, die die cDNAs mit zwei flankierenden (5' und 3') Promotoren enthalten. Dadurch sollten statistisch gleiche Mengen von sense- und antisense-RNA gebildet werden, die über RNAi zum Knockout des entsprechenden endogenen Gens führen. Der Read-Out kann anschließend durch digitale Hochdurchsatz-Bildverarbeitungssysteme wie z. B. dem "HTS Cell Imaging System" von Becton Dickinson erreicht werden.

In bestimmten Fällen ist die Verwendung von Zielorganismen bevorzugt, die einen Reportervektor enthalten. Alternativ kann ein Reportervektor auch zusammen mit dem Expressionsvektor in den Zielorganismus eingebracht werden.

Das Einbringen von Expressionsvektor und gegebenenfalls Reportervektor in die Zielorganismen erfolgt nach grundsätzlich aus dem Stand der Technik bekannten Methoden zur (Co)transfektion, (Co)transformation oder (Co)infektion von Zellen. Dabei sollte jedoch eine Methode gewählt werden, die eine hohe Effizienz des Einbringens von Fremdnukleinsäuren in den Zielorganismus erlaubt, z. B. eine Effizienz von mindestens 1%.

Bei eukaryontischen Zielzellen erfolgt die Transfektion bzw. Cotransfektion vorzugsweise durch Calciumphosphat-Copräzipitation, Lipofektion, Elektroporation, Partikelbeschuß, Verwendung von Bakterienproteinen oder virale Infektion (Retroviren, Adenoviren, Sendaviren etc.). In den durch Transfektion oder Cotransfektion erzeugten Zielzellen kann der Expressionsvektor transient, der Reportervektor transient oder stabil exprimiert werden. Eine transiente Expression ist bevorzugt.

Bei der bevorzugten Cotransfektion wird der Expressionsvektor günstigerweise in einem molaren Überschuß bezüglich des Reportervektors eingesetzt. Besonders bevorzugt beträgt das Molverhältnis zwischen Reportervektor und Expressionsvektor 1 : 2 bis 1 : 20. Bei Verwendung des Expressionsvektors im molaren Überschuß kann die Anwesenheit des Reportervektors im Zielorganismus als Marker für das gleichzeitige Vorhandensein des Expressionsvektors im Zielorganismus dienen, da Organismen bei einer Cotransfektion die eingesetzten Plasmide entsprechend ihrem Molverhältnis im Cotransfektionsansatz aufnehmen.

Der Reportervektor wird vorzugsweise so gewählt, dass kein unmittelbarer funktioneller Zusammenhang zwischen Reporter- und Expressionsvektor besteht, d. h. dass ein von dem Expressionsvektor kodiertes Genprodukt nicht direkt auf die Aktivität des Reportervektors wirkt, sondern dass ein vom Expressionsvektor kodiertes Genprodukt nur mittelbar, d. h. über eine Beeinflussung des Metabolismus des Zielor-

ganismus auf die Aktivität des Reportervektors wirkt. Es sind jedoch auch Ausführungsformen des Screens möglich, welche eine Detektion von direkten Interaktionen zwischen Reportervektor und Expressionsvektor erlauben.

Der zusammen mit dem Expressionsvektor cotransfizierte oder bereits im Zielorganismus vorhandene Reportervektor enthält im allgemeinen eine für ein nachweisbares Genprodukt kodierende Nukleinsäuresequenz in einer im Zielorganismus exprimierbaren Form. Der Reportervektor ist vorzugsweise ein extrachromosomaler Vektor, besonders bevorzugt ein transient transfizierbares Plasmid. Andererseits kann auch ein stabiler episomaler oder chromosomaler Reportervektor eingesetzt werden. In diesem Fall enthält der Reportervektor Elemente, die eine Selektion und gegebenenfalls eine Replikation in dem Zielorganismus ermöglichen. Die Expression des nachweisbaren Genprodukts kann über eine konstitutive oder regulierbare Expressionskontrollsequenz, vorzugsweise über eine konstitutive Expressionskontrollsequenz erfolgen.

Das vom Reportervektor kodierte Genprodukt ist in einer besonders bevorzugten Ausführungsform ein sezerniertes Enzym, d. h. ein Enzym, welches vom Zielorganismus sekretiert wird. Beispiele für solche Enzyme sind die sezernierte Alkalische Phosphatase (SEAP) (Berger et al., Gene 66 1988), 1–10) sowie die Luziferase (Lui et al., Gene 202 (1977), 141–148). Besonders bevorzugt wird die SEAP als sezerniertes Enzym verwendet. Bei Verwendung sezernierter Genprodukte als Reportersystem erfolgt die Bestimmung der Aktivität im Kulturüberstand von Zielzellen. Andererseits kann das vom Reportervektor kodierte nachweisbare Genprodukt auch ein nicht sekretiertes Polypeptid sein, welches intrazellulär in einer intakten Zelle nachweisbar ist, beispielsweise ein Fluoreszenzprotein wie GFP. Ebenso kann das vom Reportervektor exprimierte nachweisbare Genprodukt auch ein membranständiges, z. B. durch Inkubation mit Antikörpern oder Affinitätsliganden nachweisbares Polypeptid sein.

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt im übrigen auch die Verwendung mehrerer Reportervektoren, von denen einer bereits (chromosomal oder extrachromosomal) im Zielorganismus vorliegt und ein anderer mittels Cotransfektion zusammen mit dem Expressionsvektor in den Zielorganismus eingeführt wird. Dadurch wird vermieden, dass zuviel DNA als Reporterplasmid eingesetzt werden muss und nicht genug DNA der zu testenden Gene aus der Bibliothek. So kann z. B. das cotransfizierte Plasmid für eine nukleäre GFP-Variante kodieren, die verwendet wird, um die transfizierten Zellen zu identifizieren. In den Zellen wird bereits ein Fusionsprotein mit einer anderen spektralen Variante von GFP stabil exprimiert, das im Cytoplasma lokalisiert ist. Entsprechende Varianten von GFP sind in der einschlägigen Literatur beschrieben (Haseloff, Meth. Cell. Biol. 58 (1999), 139–151). Kann eines der Gene aus der Bibliothek dazu führen, dass das Fusionsprotein in den Kern transloziert wird, so ist das durch die Überlagerung der verschiedenen Emissionen der beiden GFP Varianten durch entsprechende Bildverarbeitungsprogramme zu detektieren.

Darüber hinaus können Zellen verwendet werden, in die Reporterplasmide an definierten Positionen im Genom stabil integriert werden. Durch solche "knock-in" Experimente wird ein endogenes Gen durch das Reporterplasmid ersetzt (Elefanty et al., PNAS USA 95 (1998), 11897–11902). Dessen Aktivität spiegelt dann die transkriptionelle Aktivierung des ersetzten Gens wieder. Stabil transfizierte Zellen können auch zum Test auf Telomeraseaktivität benutzt werden. Dazu kann ein Reporterplasmid in die Telomere stabil integriert werden. Wenn die Länge der Telomere verringert wird, so sollte auch die Aktivität des Reporterplasids ver-

ringert oder (wenn nur eines vorliegt) ganz reduziert werden. Weiter können Zelllinien verwendet werden, die GFP-Fusionsproteine von sezernierten Proteinen exprimieren. Da die Proteine sezerniert werden, ist keine Fluoreszenz in den Zellen zu beobachten. Werden die Zellen mit Genen transfiziert, die zur Hemmung der Sekretion führen, so ist das durch eine Zunahme der GFP-Fluoreszenz zu beobachten. Dies wurde durch die physikalische Hemmung des Transportes von einem GFP-Fusionsprotein bereits gezeigt (Kaet-her and Gerdes, FEBS Lett. 369 (1995), 267–271). Mehrere Krankheiten beruhen auf einer erhöhten Sekretion von Proteinen (z. B. Alzheimer Krankheit). Umgekehrt können Gene identifiziert werden, die zur Reifung von sezernierten Proteinen führen: die Aktivität des Proteins kann dann durch geeignete Methoden im Medium detektiert werden. Dabei kann es sich um Fusionsproteine mit katalytischen Eigenschaften handeln. Alternativ kann auch die Abnahme der Fluoreszenz von GFP-Fusionsproteinen im Cytoplasma der Zellen bestimmt werden.

Schritt (b) des erfindungsgemäßen Verfahrens beinhaltet die Expression der Nukleinsäuresequenz in den Zielorganismen. Hierzu werden – abhängig von den jeweils verwendeten Expressionsvektoren – Zielorganismen unter geeigneten Bedingungen kultiviert, die eine Expression der mit der Expressionskontrollsequenz des Expressionsvektors operativ verknüpften, zu testenden Nukleinsäuresequenz erlauben. Durch die bevorzugte Expression von nur einer einzigen Nukleinsäureart pro Population von Zielorganismen kann eine besonders effiziente Expressionsleistung erzielt werden.

Schritt (c) des Verfahrens beinhaltet die Bestimmung der Aktivität der Nukleinsäuresequenz in den einzelnen Populationen von Zielorganismen. Die Bestimmung beinhaltet jeweils eine separate Untersuchung einzelner Zielorganismuspotionen, vorzugsweise von jeweils mehreren Zielorganismen und besonders bevorzugt im wesentlichen allen Zielorganismen der Gesamtpopulation. Die Größe der Gesamtpopulation ist von der jeweiligen Zielorganismen abhängig. Wenn es sich bei den Zielorganismen um Zellen handelt, beträgt die Populationsgröße vorzugsweise von etwa 10^2 bis 10^6 bei Eukaryontenzellen und vorzugsweise von etwa 10^5 bis 10^{10} bei Prokaryontenzellen. Bei komplexeren Zielorganismen ist die Populationsgröße selbstverständlich geringer und sollte etwa 2 bis 10^2 betragen.

Die Bestimmung der biologischen Aktivität der Nukleinsäuresequenz kann grundsätzlich die Bestimmung beliebiger phänotypisch erkennbarer Effekte, z. B. morphologische Veränderungen, verändertes Wachstumsverhalten, etc. umfassen. Falls der Zielorganismus einen Reportervektor enthält, können Änderungen in der Aktivität des Reportervektors, d. h. insbesondere des vom Reportervektor kodierten Genprodukts, als Maß für die Aktivität der untersuchten Nukleinsäuresequenz verwendet werden. Diese Bestimmungsmethode beruht darauf, dass die auf dem Expressionsvektor befindliche zu untersuchende Nukleinsäuresequenz im Zielorganismus nach Expression einen Einfluß auf den Zellmetabolismus aufweist, der wiederum die Aktivität des Reportervektors bzw. des von ihm kodierten nachweisbaren Genprodukts auf meßbare Weise beeinflusst. Dabei kann die Aktivität des Reportervektors an mindestens zwei Punkten nach der Transfektion oder Cotransfektion bestimmt werden, wobei der erste Zeitpunkt so gewählt wird, dass eine Expression der auf dem Expressionsvektor enthaltenen Nukleinsäuresequenz noch keinen Einfluß auf die Aktivität des Reportervektors hat, und somit dazu dienen kann, eine Basisaktivität für den jeweils untersuchten Zielorganismus festzulegen. Der zweite Zeitpunkt wird so gewählt, dass eine Expression der auf dem Expressionsvektor enthaltenen

Nukleinsäuresequenz bereits einen meßbaren Einfluß auf die Aktivität des Reportervektors hat – sofern die im jeweiligen Organismus vorhandene Nukleinsäuresequenz die untersuchte Aktivität aufweist. Auf diese Weise kann unabhängig von der Basisaktivität des Reportervektors, die von der Transfektionseffizienz bei der Transfektion oder Cotransfektion abhängt, die Aktivität einer in einen bestimmten Organismus eingeführten Nukleinsäuresequenz bestimmt werden.

Wenn das erfindungsgemäße Verfahren zur Identifizierung von Nukleinsäuresequenzen eingesetzt wird, die einen Einfluß auf sekretorische Eigenschaften der Zielzelle haben, ist die Messung der Aktivität des Reportervektors im Zellüberstand zur Identifizierung der gewünschten Nukleinsäuresequenzen ausreichend. In anderen Ausführungsformen des Verfahrens kann das vom Reportervektor kodierte nachweisbare Genprodukt, z. B. ein Fluoreszenzprotein wie GFP, intrazellulär zur Markierung der transfizierten Organismen exprimiert werden. Diese Markierung kann gegebenenfalls mit der Detektion zusätzlicher zellulärer Parameter, z. B. Detektion von Oberflächenmarkern mit Antikörpern oder Rezeptorliganden, kombiniert werden. Zur Detektion dieser zusätzlichen Parameter können fluoreszierende Reagenzien eingesetzt werden. Das Vorhandensein, die subzelluläre Verteilung oder/und die Intensität der Markierung(en) auf den Organismen können dann durch Fluoreszenzcytometrie, z. B. mittels FACS (Fluorescence activated cell sorting) oder Imaging Assays bestimmt werden.

Das Verfahren kann als zumindest teilweise automatisierter Reihenscreen durchgeführt werden, wobei vorzugsweise die Schritte (a) bis (c) an mindestens 50 Populationen von Zielorganismen jeweils parallel durchgeführt werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Verfahren als Mehrstufen-Protokoll durchgeführt. Dabei werden insbesondere Nukleinsäuresequenzen bestimmt, die die Ausprägung einer bestimmten physiologischen Reaktion des Zielorganismus verhindern bzw. hemmen oder verstärken bzw. auslösen können. Hierzu wird den Zielorganismen ein Stimulus, z. B. ein Pharmakon oder therapeutischer Wirkstoff, zugegeben, dessen Aktivität durch die zu untersuchende Nukleinsäure beeinflusst werden kann. Die Zugabe des Stimulus, bei dem es sich um eine oder mehrere physiologisch wirksame Substanzen, z. B. Rezeptorliganden, Arzneimittel, Cytokine etc. handeln kann, kann vor, während oder nach dem Einbringen der zu untersuchenden Nukleinsäuresequenz in die Population von Zielorganismen erfolgen. Somit kann das erfindungsgemäße Verfahren zusätzlich einen Screen zur Bestimmung von Wechselwirkungen zwischen den biologischen Aktivitäten von zu untersuchenden Nukleinsäuren und Stimuli darstellen.

Das hier beschriebene Verfahren kann daher zur Optimierung von therapeutischen Reagenzien dienen. So können Gene bestimmt werden, die den Effekt des Therapeutikums hemmen können. Werden diese Gene später durch einen entsprechenden Eingriff bei Zugabe des Therapeutikums gehemmt, kann dessen Effekt verstärkt werden.

Beispielsweise kann der induzierbare Transkriptionsfaktor NF- κ B durch Natriumsalicylsäure (Aspirin) gehemmt werden (Kopp and Ghosh, Science 265 (1994), 956–959). Dies wird durch die Hemmung einer Kinase erreicht, die den spezifischen Inhibitor I κ B phosphorylieren kann und dadurch zu dessen Abbau führt (Yin et al., Nature 396 (1998), 77–80). Die Hemmung durch Aspirin sollte durch die Transfektion und nachfolgende Überexpression der transaktivierenden Untereinheit p65 (relA) aufgehoben werden können. Dadurch ist ein Gen identifiziert, das nicht direkter Angriffspunkt des Therapeutikums ist und dessen Hemmung den Effekt von Aspirin verstärken kann.

Der Screen lässt sich auch dazu einsetzen, Gene zu bestimmen, die die Aktivität von Pharmaka verstärken, z. B. kann die Cotransfektion von IκB die Hemmung des induzierbaren Transkriptionsfaktors NF-κB durch Aspirin verstärken. Auch hier ist das identifizierbare Gen nicht dasjenige, auf das das Pharmacon selbst wirkt.

Sowohl durch die Verstärkung des Effekts eines Pharmacons als auch durch dessen Hemmung, lassen sich neue Ansätze für therapeutische Eingriffe in der Zelle bestimmen.

In noch einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kann die Population von Zielorganismen nach dem Einbringen der zu untersuchenden Nukleinsäuresequenz zusammen mit weiteren Organismen (Testorganismen), z. B. einer weiteren Zelllinie, kultiviert werden und die Reaktion der Testorganismen auf die zu untersuchende Nukleinsäuresequenz untersucht werden. Der Testorganismus kann einen Reportervektor wie zuvor beschrieben enthalten. Auf diese Weise lassen sich nicht nur sezernierte Proteine detektieren, sondern auch solche, die membranständig sind und über direkte Zell-Zell-Interaktionen gegebenenfalls in Kombination mit Oberflächenmarkern des Testorganismus wirken können.

Die Zielorganismen können vor, während oder nach dem Einbringen der zu untersuchenden Nukleinsäuresequenz mit Viren infiziert werden und der Einfluß der zu untersuchenden Nukleinsäuresequenz auf das Verhalten der Zielorganismen gegenüber den Viren, z. B. Hemmung oder Aktivierung der Replikation oder des Eintritts des Virus in die Zellen bestimmt werden.

Anstelle von Viren können aber auch andere pathogene Organismen, wie z. B. Bakterien verwendet werden. Im Unterschied zu der, zuvor beschriebenen Anwendung des Screens wird hier die Auswirkung der durch die transfizierte Gene verursachten Veränderungen in den Zielorganismen auf den Vermehrungszyklus der Wirtsorganismen (Viren, Bakterien) und nicht der direkte Effekt auf die Zielorganismen. In dieser Anwendung kann man z. B. erwarten, Gene zu isolieren, die Rezeptoren für den Eintritt der Viren in die Zellen herunterregulieren.

So kann z. B. eine weitere Zelllinie zu den transfizierten Zellen gegeben werden, die ein Reporterplasmid enthält, das eine DNA-Bindungsstelle für einen definierten Transkriptionsfaktor (z. B. NF-κB) aufweist und daher von ihm aktiviert wird.

Auf diese Art können sezernierte oder membranständige Proteine durch den Screen detektiert werden, die zur Aktivierung eines Transkriptionsfaktors führen. Z. B. kann der induzierbare Transkriptionsfaktor NF-κB (Baeuerle and Baltimore, Cell 87 (1996), 13–20) in den Testorganismen detektiert werden, nachdem Gene für Aktivatorproteine wie z. B. TNF (Baldwin, Annu. Rev. Immunol. 14 (1996), 649–683) in die Zellen transfiziert worden sind.

Die Optimierung der biologischen Aktivität von Nukleinsäuresequenzen stellt noch eine weitere Ausführungsform der Erfindung dar. Hierzu kann eine gegebene Nukleinsäuresequenz einer Mutagenese, z. B. einer Mutagenese durch PCR, durch Random PCR (Cadwell and Joyce, PCR Methods Appl. 2 (1992), 28–33), durch "DNA shuffling" (Harayama, Trends Biotechnol. 16, 1998), 76–82) oder einer Fusion mit statistischen Nukleinsäuresequenzen (an den Enden oder im Inneren der gegebenen Nukleinsäuresequenz) unterzogen werden, um die für Schritt (a) des Verfahrens benötigte Vielzahl von Nukleinsäuresequenzen bereitzustellen. Bevorzugte Beispiele für den Screen von derart mutagenisierten Nukleinsäurewechselwirkungen sind Nukleinsäuren, die für einen Rezeptor kodieren, und die auf eine optimierte Wechselwirkung mit einem oder mehreren Liganden getestet werden sollen. Umgekehrt können entsprechend Nukleinsäuresequenzen optimiert werden, die für einen an

einen Rezeptor bindefähigen Peptid- oder Proteinliganden kodieren, und deren Wechselwirkung mit dem Rezeptor optimiert werden soll. Entsprechende Ansätze können durch Mutagenese von Cytokinen mittels "DNA shuffling" zur Optimierung ihres Effekts durchgeführt werden (Chang et al., Nat. Biotechnol. 17 (1999), 793–797).

Noch ein weiteres Beispiel ist die Mutagenese von Nukleinsäuresequenzen, die für Antigen-Binderegionen von Antikörpern, beispielsweise von Einzelketten-Antikörpern kodieren, um die Bindefähigkeit der von den Sequenzen kodierten Genprodukte an bestimmte Antigene zu optimieren. Noch ein weiteres Beispiel ist die Mutagenisierung von Effektorsequenzen, z. B. der die Aufnahme von Proteinen in Zellen fördernden TAT-Sequenz. Hierzu kann die TAT-Sequenz an ein bestimmtes Gen fusioniert werden und durch Mutagenese der TAT-Sequenz die für das jeweilige Genprodukt optimale TAT-Variante zu bestimmen. In dieser Ausführungsform wird der Screen vorzugsweise nicht an unbekannten Nukleinsäuresequenzen, sondern an Varianten von bekannten Nukleinsäuresequenzen durchgeführt, die durch Mutagenese oder natürliche Mutation erzeugt worden sind. Diese Nukleinsäure-Optimierung kann über mehrere Zyklen erfolgen, wobei in einem ersten Zyklus identifizierte Nukleinsäuresequenzen mit einer gewünschten biologischen Aktivität in einem oder mehreren nachfolgenden Zyklen weiteren Mutageneseprozeduren unterzogen werden.

Die durch das erfindungsgemäße Verfahren identifizierten Gene können zur Bereitstellung diagnostischer und therapeutischer Mittel eingesetzt werden. So können bei Durchführung des Verfahrens unterschiedliche Zielzellen (normale Zellen, Tumorzellen) verwendet werden. Es können auch Zellen mit definierten genetischen Veränderungen wie z. B. Zellen mit aktivierten Onkogenen oder inaktivierten Tumorsuppressorgenen, sowie Virus-infizierte Zellen für den Screen benutzt werden. Dadurch können Nukleinsäuresequenzen identifiziert bzw. isoliert werden, welche ihre Aktivität selektiv in bestimmten Zelltypen aufweisen, z. B. Gene, die selektiv in Tumorzellen oder virusinfizierten Zellen wirken. Diese Gene könnten dann beispielsweise zur gentherapeutischen Bekämpfung von Tumorerkrankungen oder Virusinfektionen im Körper von Patienten exprimiert werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist universell auf beliebige Arten von Zielorganismen anwendbar. So können bei Verwendung von Bakterienzellen als Zielorganismen Nukleinsäuresequenzen identifiziert werden, die für ein Antibiotikaresistenzprotein oder für ein Protein mit antibakterieller Wirkung kodieren. Sogenannte "Defensine" sind bei verschiedenen Organismen beschrieben worden (Hancock and Lehrer, Trends Biotechnol. 16 (1998), 82–88). Diese Peptide sind vorzugsweise für Bakterien toxisch, da sie zu einer Lyse der Bakterienmembran führen.

Bei Verwendung von Patientenzellen, die einen genetischen Defekt haben, als Zielorganismen, kann nach Nukleinsäuresequenzen gesucht werden, die in der Lage sind, diesen Defekt zu beheben. Weiterhin läßt sich das Screeningverfahren auf eine Transfektionsoptimierung für die Anwendung in der Gentherapie und die Identifizierung von Reporterplasmiden, die die Aktivierung von Kinasen detektieren können, ausweiten.

Zur Optimierung der Gentherapie werden die Zellen mit Genen einer Genbibliothek transfiziert, um die Nukleinsäuren zu bestimmen, die zur verbesserten Aufnahme von in der Gentherapie benutzten Vektoren führen.

Die Automatisierung des Verfahrens kann z. B. in einer Vorrichtung gemäß DE 199 50 585.0 erfolgen. Diese Vorrichtung enthält bevorzugt zwei Roboter: einen für die Isolation der Plasmid DNA aus den Wirtszellen und einen für die

Transfektion von Zielzellen (Fig. 1 und 2). Der DNA Isolationsroboter umfaßt Mittel zur Kultivierung einer Vielzahl von Wirtszellen, beispielsweise einen Block oder eine Mikrotiterplatte. Die Kulturvolumina für die Wirtszellen liegen vorzugsweise im Bereich von 0,5–2,5 ml, besonders bevorzugt im Bereich von 0,5 bis 1 ml. Weiterhin umfaßt die Vorrichtung Mittel zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus einer Vielzahl von Wirtszellen, bei denen es sich beispielsweise um Mikrotiterplatten oder Blöcke handelt, die gegebenenfalls Minisäulen zur Aufreinigung der Plasmid-DNA enthalten können. Der Transfektionsroboter enthält Mittel zur Transfektion und Kultivierung einer Vielzahl von Zielzellen, bei denen es sich ebenfalls um Blöcke oder Mikrotiterplatten handeln kann. Schließlich enthält die Vorrichtung Mittel zur Bestimmung der Aktivität eines Reportervektors in Zielzellen, vorzugsweise ein spektrophotometrisches Meßgerät oder ein Fluoreszenzmeßgerät. Beide Roboter arbeiten mit Mehrkanalpipetten, wobei die jeweiligen Flüssigkeiten gleichzeitig pipettiert werden können, um einen entsprechenden Probendurchsatz zu erreichen.

Eine Vielzahl von möglichen Roboter Ausführungen ist möglich, um den Screen durchzuführen. Gezeigt sind in Fig. 1 und 2 zwei bevorzugte Ausführungsformen, bei denen die behandelten Platten mit den DNA Proben und den Wirtszellen bzw. die DNA-Proben und die Zielzellen auf einer Fläche ausgelegt werden und durch einen Pipettierkopf, der in x,y,z-Richtung beweglich ist, miteinander verbunden sind.

Weiterhin wird die Erfindung durch die nachfolgend beschriebenen Figuren näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 eine schematische Darstellung des DNA Isolationsroboters. Lagerungsplätze für Blöcke z. B. 96-well Blöcke mit Wirtszellen oder der daraus isolierten DNA und deren Zwischenstufen sind als A, B, C, d bezeichnet. Die für die DNA Gewinnung notwendigen Reagenzien sind zu beiden Seiten angeordnet. P1, P2, P4, SiOx (Siliciumoxid-Lösung) Acet. (Aceton-Lösung), und H₂O bezeichnen Reservoirs mit entsprechenden Lösungen, die für die DNA-Gewinnung benötigt werden. Eine Waschstation ("washing") wird zum Reinigen der Spritzen des Pipettierkopfes benötigt. Mittel zum Zentrifugieren, ("centrifuge"), zum Anlegen eines Vakuums ("vacuum"), zum Schütteln (shaking) und Inkubationsstationen (inc.) dienen zur Bearbeitung der Platten für die Aufreinigung der DNA. Ein über die gesamte Fläche beweglicher Pipettierkopf mit Greifarm, der durch Antriebe (X, Y, Z) in verschiedene Richtungen bewegt werden kann, verbindet die Platten und die Bearbeitungsstationen untereinander. In der oberen Bildhälfte ist der Roboter in einer Seitenansicht gezeigt.

Fig. 2 eine schematische Darstellung des Transfektionsroboters. Die Zielzellen für die Transfektion sind in vier übereinander angeordneten Reichen in Multiwell-Platten eingezeichnet. Die zu transfizierenden DNA-Proben sind in der obersten Reihe in 96-well Platten angeordnet. In der darunterliegenden Reihe werden die Transfektionsreaktionen angesetzt. Die dazu zusätzlich zur DNA benötigten Reagenzien sind als L1 und L2 bezeichnet. Eine Waschstation, ebenso wie eine Abfallstation (waste) dient der Säuberung der Spritzen des Pipettierkopfes ("Z"), der in X, Y, Z Richtung beweglich ist und durch entsprechende Schrittmotoren (X, Y, Z) angetrieben wird. Am oberen und rechten Bildrand ist eine seitliche Ansicht des Roboters bzw. des beweglichen Pipettierkopfes eingezeichnet.

Patentsprüche

1. Verfahren zur Bestimmung der biologischen Aktivität von Nukleinsäuresequenzen, umfassend die Schritte:

- (a) paralleles Einbringen einer Vielzahl von Expressionsvektoren, die jeweils eine zu untersuchende Nukleinsäuresequenz in operativer Verknüpfung mit einer Expressionskontrollsequenz enthalten, in eine Vielzahl von jeweils separaten Populationen gleichartiger Zielorganismen, wobei jeweils nur eine einzige Nukleinsäuresequenz oder eine geringe Anzahl von verschiedenen Nukleinsäuresequenzen in eine separate Population gleichartiger Zielorganismen eingebracht wird,
- (b) Bewirken einer Expression der Nukleinsäuresequenz in den Zielorganismen, und
- (c) Bestimmen der Aktivität der Nukleinsäuresequenz in den einzelnen Populationen von Zielorganismen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuresequenzen aus genomischen Sequenzen, cDNA-Sequenzen, cDNA-Fragmenten und Antisense-Molekülen beliebiger Herkunft ausgewählt werden.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass für RNAi geeignete Nukleinsäuren verwendet werden.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuresequenzen aus einer normalisierten cDNA-Bibliothek stammen.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuresequenzen aus Bibliotheken, die eine Kollektion bekannter Sequenzen enthalten, stammen.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuresequenzen aus Eukaryonten, Bakterien, Archaea, Viren oder aus synthetischen oder semisynthetischen Quellen stammen.

7. Verfahren nach Anspruch einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuresequenzen eine nicht-selektivnirbare Aktivität aufweisen.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuresequenzen eine selektionierbare Aktivität aufweisen.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, da man als Expressionsvektor ein Plasmid verwendet.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass der Expressionsvektor durch Kultivierung von Wirtszellen und Gewinnung aus den kultivierten Wirtszellen bereitgestellt wird.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass der Expressionsvektor durch eine in vitro Amplifikation bereitgestellt wird.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man als Zielorganismen gegebenenfalls genetisch manipulierte eukaryontische Zellen oder Organismen, gegebenenfalls genetisch manipulierte prokaryontische Zellen, Patientenzenen oder natürliche Mutanten verwendet.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass man eukaryontische Zellen als Zielorganismen verwendet und das Einbringen des Expressionsvektors durch Calciumphosphat-Coprazipitation, Lipofektion, Elektroporation, Partikelbeschuss oder virale Infektion erfolgt.

14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Expressionsvektor zusammen mit einem Reportervektor in die

Zielorganismen eingebracht wird.

15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Expressionsvektor in Zielorganismen eingebracht wird, die bereits einen Reportervektor enthalten.

16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass der Reportervektor an einer definierten Stelle im Genom lokalisiert ist.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass der Reportervektor eine für ein nachweisbares Genprodukt kodierende Nukleinsäuresequenz in exprimierbarer Form enthält.

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass das nachweisbare Genprodukt aus sezernierten Enzymen ausgewählt wird.

19. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass das nachweisbare Genprodukt aus intrazellulär nachweisbaren Polypeptiden ausgewählt wird.

20. Verfahren nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, dass das nachweisbare Genprodukt aus Fluoreszenzproteinen ausgewählt wird.

21. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass das nachweisbare Genprodukt aus membranständigen nachweisbaren Polypeptiden ausgewählt wird.

22. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung der Aktivität der Nukleinsäuresequenz eine Untersuchung der Zielorganismen auf morphologische Veränderungen, Veränderungen im Wachstumsverhalten oder Veränderungen in der Aktivität eines Reportervektors umfassen.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzliche Parameter der Zielorganismen analysiert werden.

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung durch Fluoreszenzcytometrie oder Imaging Assays erfolgt.

25. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Durchführung zumindest teilweise automatisiert wird.

26. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Schritte (a) bis (c) an mindestens 50 Populationen von Zielorganismen jeweils parallel durchgeführt werden.

27. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, umfassend das Zugeben eines Stimulus, dessen Aktivität durch die zu untersuchenden Nukleinsäure im Zielorganismus beeinflusst werden kann.

28. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, dass der Stimulus durch ein Pharmacon erzeugt wird.

29. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, umfassend das Zugeben eines Testorganismus in Schritt (b), der vom Zielorganismus verschieden ist.

30. Verfahren nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass als Testorganismus eine Zelllinie verwendet wird.

31. Verfahren nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass als Testorganismus ein Virus oder ein Bakterium verwendet wird.

32. Verfahren nach einem der Ansprüche 29 bis 31, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt (c) die Wirkung der zu untersuchenden Nukleinsäuresequenz auf den Testorganismus bestimmt wird.

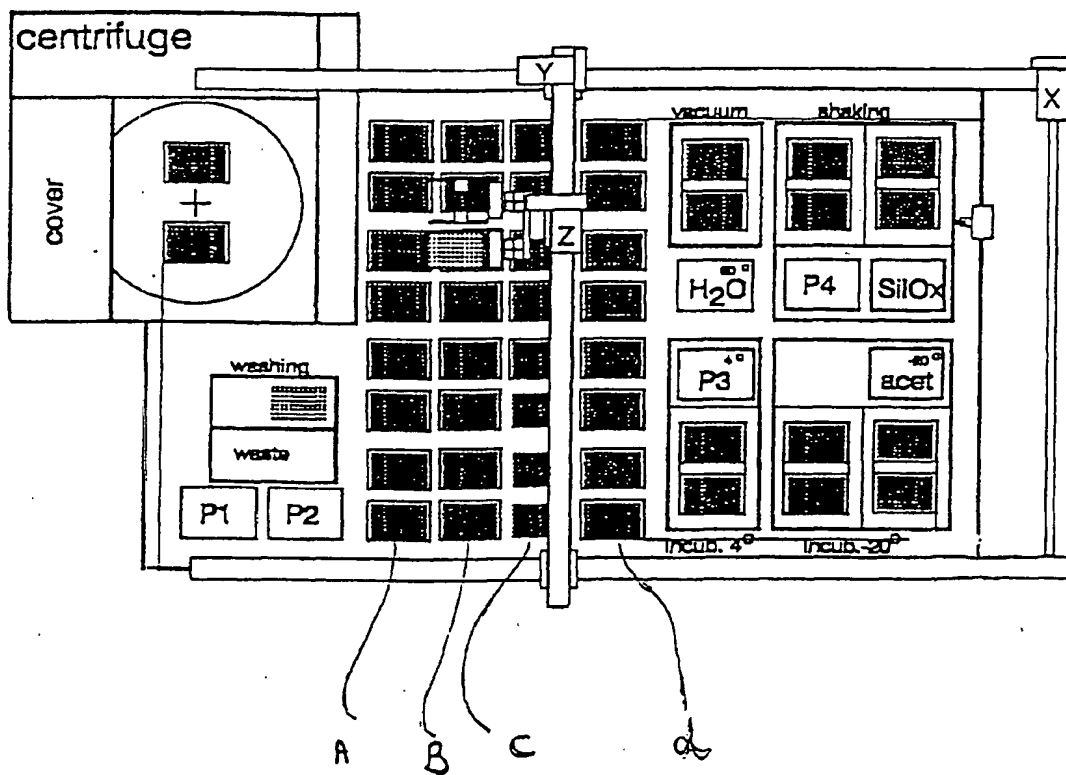
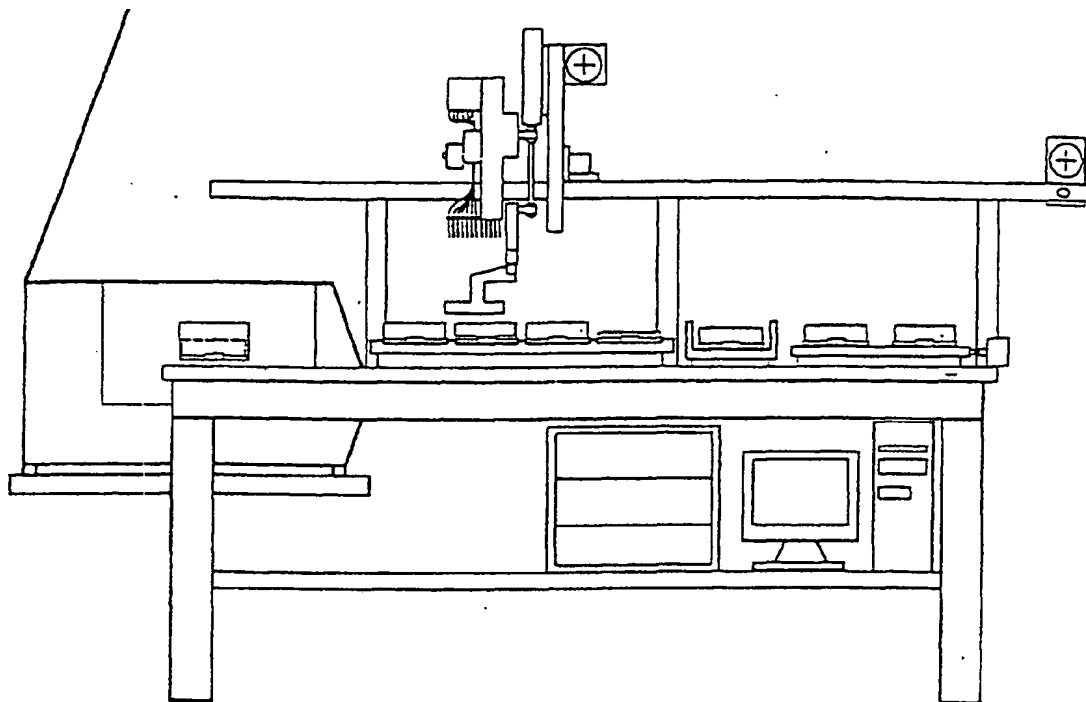
33. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Optimierung von Nukleinsäuresequenzen.

34. Verfahren nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet,

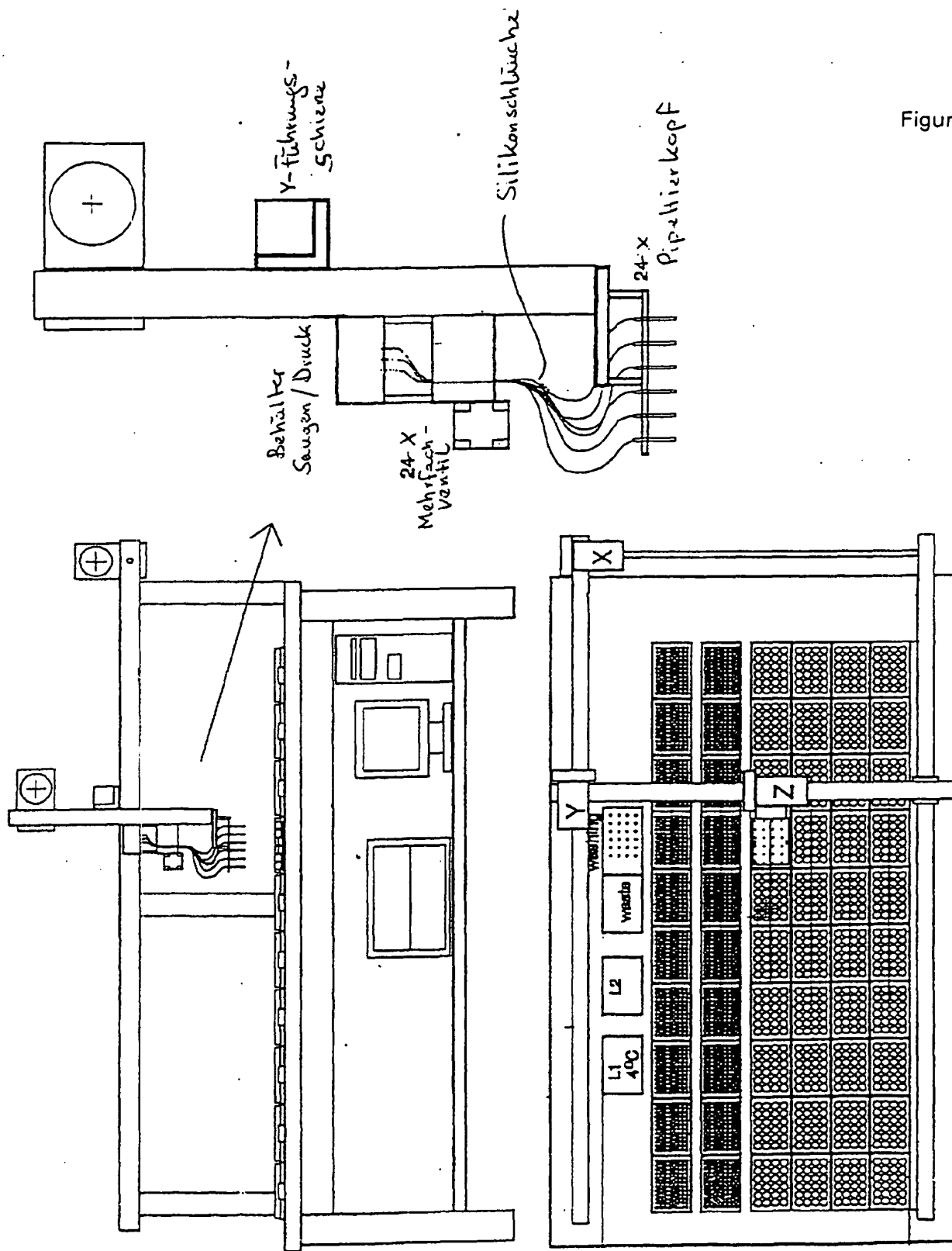
zeichnet, dass man eine Vielzahl von Varianten einer bekannten Nukleinsäuresequenz testet.

35. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, weiterhin umfassend die Verwendung der identifizierten Nukleinsäuresequenzen zur Bereitstellung diagnostischer und therapeutischer Mittel.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen



Figur 1



Figur 2